

NOUVELLES SÉQUENCES PHOSPHORYLÉES DE LA PHOSPHATASE CDC25B, ANTICORPS DIRIGÉS CONTRE CES SÉQUENCES AINSI QUE LEUR UTILISATION

5

La présente invention a pour objet de nouvelles séquences phosphorylées de la phosphatase CDC25B ainsi que des anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre ces séquences. La présente invention a également pour objet l'utilisation de ces nouvelles séquences phosphorylées notamment pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* de cancers chez l'homme ou l'animal.

10

Les mécanismes qui contrôlent la division des cellules mettent en jeu de nombreux acteurs dont les activités sont régulées par des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation, impliquant des kinases et des phosphatases. Des dérégulations de ces mécanismes ont été identifiées dans de nombreux cancers. Leur identification et 15 leur caractérisation ouvrent aujourd'hui de nouvelles perspectives pour le diagnostic et le traitement de la maladie cancéreuse.

15

CDC25B est une phosphatase régulatrice du cycle cellulaire essentielle pour le contrôle de l'entrée en mitose. Elle appartient à une famille qui compte trois membres codés par des gènes différents (CDC25A, B et C) chez les mammifères. La protéine 20 CDC25B est exprimée et active en fin de phase G2 du cycle cellulaire (Baldin et al., 1997 ; Gabrielli et al., 1996). Sa localisation intracellulaire est régulée par des séquences NES et NLS (Davezac et al., 2000) et par son interaction avec les protéines 14-3-3 (Mils et al., 2000 ; Forrest et al., 2001). Il a été suggéré que CDC25B puisse agir comme un "starter" des événements mitotiques précoces (Nilsson et al., 2000). Elle 25 pourrait jouer un rôle dans l'activation initiale d'une population de CDC2/cycline B au niveau du centrosome avant sa translocation nucléaire (Kumagai et al., 1992 ; Hoffmann et al., 1993). CDC25B active les complexes CDK/cycline pour permettre les remaniements architecturaux et biochimiques qui sont nécessaires pour permettre le processus de division cellulaire. Son activité est régulée par les variations de son 30 expression, par son association à des partenaires régulateurs et par des événements de phosphorylation.

25

La protéine kinase Aurora A, également connue sous le nom de STK5, est surexprimée dans de nombreuses tumeurs du sein. Cette expression est corrélée avec un haut grade tumoral (Bischoff et al., 1998 ; Zhou et al., 1998). Cette kinase est codée par

30

le gène STK15 localisé que le locus 20q13, un amplicon présent dans de nombreuses tumeurs. Cette protéine est localisée au niveau du centrosome (Dutertre et al., 2002). Sa fonction semble importante pour la séparation des centrosomes (Giet et al., 2000), leur duplication (Zhou et al., 1998) et l'assemblage d'un fuseau mitotique bipolaire (Giet et al., 2000). L'inhibition de sa fonction par la technologie de l'ARN interférence conduit à la formation de fuseaux monopolaires et sa surexpression est responsable d'une amplification centrosomale et d'une polyploïdisation (Meraldi et al., 2002 ; Bischoff et al., 1998 ; Zhou et al., 1998).

5 A ce jour, l'identification des substrats de la kinase Aurora A est encore très parcellaire. La phosphatase CDC25B est le premier substrat identifié qui est également co-localisé au niveau des centrosomes et joue un rôle clair dans le contrôle du cycle cellulaire et de la prolifération.

10 La présente invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs du site de phosphorylation *in vitro* de la phosphatase CDC25B par la kinase Aurora A, et de l'identification de la séquence phosphorylée du variant d'épissage CDC25B3 de 15 CDC25B sur le résidu sérine en position 353.

15 L'un des buts de la présente invention consiste à fournir de nouvelles séquences phosphorylées des différents variants de la phosphatase CDC25B.

20 Un autre but de l'invention consiste à fournir un nouvel anticorps dirigé contre une phosphatase CDC25B phosphorylée, ledit anticorps pouvant être utilisé dans le cadre d'un diagnostic médical, ou pour la préparation de cibles pour l'identification de molécules liant ladite séquence phosphorylée et susceptibles de représenter de nouveaux agents utilisables en pharmacologie anti-tumorale.

25 Un autre but de l'invention consiste à fournir un nouvel outil pour l'étude des mécanismes moléculaires qui conduisent à la polyploïdisation et à la transformation cellulaire, ainsi qu'un nouvel outil permettant la mise en évidence de l'activité de la kinase Aurora A sur un de ses substrats physiologiques, et par conséquent l'identification d'éventuelles perturbations quantitatives, temporelles et spatiales de cette activité.

30 La présente invention concerne une séquence peptidique caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par un fragment d'au moins environ 10 acides aminés issus de la séquence SEQ ID NO : 1 suivante :

TPVQNKR_nRS_pVTPPEEQQE

SEQ ID NO : 1

dans laquelle le résidu sérine en position 10 est phosphorylé, notamment par traitement *in vitro* de la séquence SEQ ID NO : 1 par la kinase Aurora A,
ledit fragment susmentionné contenant ledit résidu sérine phosphorylé.

L'expression "résidu phosphorylé" désigne un acide aminé porteur d'un
5 groupement phosphate.

La présente invention concerne également une séquence peptidique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par la séquence SEQ ID NO : 2 suivante :

QNKRRRS_pVTPPEEQ

SEQ ID NO : 2

10 dans laquelle le résidu sérine en position 7 est phosphorylé.

La séquence SEQ ID NO : 2 correspond à un fragment de la séquence SEQ ID NO : 1 susmentionnée. Plus exactement, elle correspond au fragment de SEQ ID NO : 1 délimité de l'acide aminé en position 4 à l'acide aminé en position 17.

15 La présente invention concerne également une séquence peptidique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par l'une des séquences suivantes :

– la séquence SEQ ID NO : 3, représentant le variant d'épissage CDC25B1 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 339 est phosphorylé,

20 – la séquence SEQ ID NO : 4, représentant un variant d'épissage CDC25B2 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 312 est phosphorylé,

– la séquence SEQ ID NO : 5, représentant un variant d'épissage CDC25B3 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 25 353 est phosphorylé,

– la séquence SEQ ID NO : 6, représentant un variant d'épissage CDC25B4 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 374 est phosphorylé,

30 – la séquence SEQ ID NO : 7, représentant un variant d'épissage CDC25B5 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 361 est phosphorylé.

La présente invention concerne également un anticorps polyclonal ou monoclonal susceptible de reconnaître une séquence peptidique telle que définie précédemment.

Un anticorps polyclonal avantageux de l'invention est caractérisé en ce qu'il est susceptible de reconnaître la séquence SEQ ID NO : 2 telle que définie ci-dessus.

Un tel anticorps dirigé contre l'épitope phosphorylé de séquence SEQ ID NO : 2 est généré en immunisant des lapins avec ledit épitope.

Plus précisément, ledit épitope est couplé de façon covalente avec une protéine porteuse telle que l'hémocyanine, le BSA ou l'ovalbumine. Les lapins sont alors immunisés pendant 3 mois (4 injections au total) et la saignée finale permet la récupération d'environ 50 ml de sérum. Le sérum est ensuite doublement purifié par affinité sur une colonne de peptide phosphorylé puis sur une colonne de peptide non phosphorylé.

La présente invention concerne également un procédé de préparation d'un anticorps monoclonal tel que défini ci-dessus, dirigé contre la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 telle que définie ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- l'immunisation d'un animal par injection de la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 telle que définie ci-dessus,
- la fusion entre des myélomes d'un animal et des splénocytes d'un animal afin d'obtenir des hybridomes,
- la mise en culture des hybridomes ainsi obtenus,
- la récupération et purification par clonage d'un hybridome, choisi parmi ceux obtenus à l'étape précédente et sécrétant un anticorps dirigé contre la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 telle que définie ci-dessus.

L'animal utilisé pour l'étape d'immunisation est notamment une souris.

Les myélomes utilisés pour la fusion proviennent notamment une souris.

Les splénocytes utilisés pour la fusion proviennent d'un animal de la même espèce que celle dont proviennent les myélomes, à savoir notamment une souris.

On choisit les hybridomes qui sécrètent les anticorps contre la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 sur la base de la production d'anticorps capables de reconnaître dans un test ELISA le peptide phosphorylé utilisé pour l'immunisation mais pas le peptide non phosphorylé.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient à titre de substance active une séquence peptidique telle que définie précédemment, un anticorps tel que défini ci-dessus, ou un anticorps

anti-idiotypique tel que défini ci-dessus, en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable.

Une composition pharmaceutique avantageuse selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle contient à titre de substance active la séquence peptidique représentée par la séquence SEQ ID NO : 2.

La présente invention concerne également l'utilisation d'une séquence peptidique telle que définie ci-dessus, d'un anticorps tel que défini ci-dessus, ou d'un anticorps anti-idiotypique tel que défini ci-dessus, pour la préparation de médicaments destinés au traitement de cancers, tels que les cancers du sein.

La présente invention concerne également l'utilisation d'un anticorps tel que défini ci-dessus, pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* de cancers chez l'homme ou l'animal, notamment de cancers du sein.

Selon un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne l'utilisation d'un anticorps polyclonal tel que défini ci-dessus, dirigé contre l'épitope phosphorylé de séquence SEQ ID NO : 2, pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* de cancers chez l'homme ou l'animal, notamment de cancers du sein.

La présente invention concerne également une méthode de diagnostic *in vitro* de cancers, notamment de cancers du sein, chez l'homme ou l'animal, caractérisée en ce qu'elle comprend :

– la mise en présence d'un anticorps tel que défini ci-dessus, avec un échantillon biologique prélevé chez un individu, ledit anticorps étant le cas échéant fixé sur un support solide,

– la détection d'une séquence peptidique telle que définie ci-dessus, susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique à l'aide de réactifs marqués, notamment d'anticorps marqués, reconnaissant soit l'anticorps lié à ladite séquence peptidique, soit la séquence peptidique liée audit anticorps dans les complexes formés lors de l'étape précédente entre l'anticorps et la séquence peptidique susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique, et ce, le cas échéant, après rinçage approprié du support solide.

La présente invention concerne également une méthode de pronostic *in vitro* de cancers, notamment de cancers du sein, chez l'homme ou l'animal, caractérisée en ce qu'elle comprend :

– la mise en présence d'un anticorps tel que défini ci-dessus, avec un échantillon tumoral prélevé chez un individu, ledit anticorps étant le cas échéant fixé sur un support solide,

5 – la détection d'une séquence peptidique telle que définie ci-dessus, susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique à l'aide de réactifs marqués, notamment d'anticorps marqués, reconnaissant soit l'anticorps lié à ladite séquence peptidique, soit la séquence peptidique liée audit anticorps dans les complexes formés lors de l'étape précédente entre l'anticorps et la séquence peptidique susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique, et ce, le cas échéant, après rinçage approprié du support solide.

10 La présente invention concerne également l'utilisation des anticorps susmentionnés de l'invention dirigés contre une séquence phosphorylée de CDC25B dans le cadre de la mise en œuvre d'un test de diagnostic visant à détecter sur des prélèvements tumoraux la présence ou non de cette séquence phosphorylée, ceci dans un but diagnostique ou pronostique.

15 La présente invention concerne également un procédé de criblage d'une molécule capable de se lier à une séquence peptidique telle que définie ci-dessus, ladite molécule étant susceptible d'être utilisée comme agent anti-tumoral ou agent anti-prolifératif tant sur les cellules en culture que chez un organisme vivant ou encore contre des agents infectieux (parasites, champignons pathogènes), caractérisé en ce qu'il comprend :

20 – la mise en présence de ladite molécule avec la séquence peptidique susmentionnée, et

25 – la détection de la liaison de ladite molécule par l'utilisation de méthodes de compétition appropriées, notamment par la compétition vis-à-vis de la liaison d'un anticorps tel que défini ci-dessus.

30 La liaison entre ladite molécule avec la séquence peptidique phosphorylée peut être détectée selon le procédé suivant : la séquence phosphorylée (substrat phosphorylé) est liée à un support solide ; l'incubation avec l'anticorps susmentionné en solution permet ensuite sa fixation qui est révélée par l'utilisation d'un anticorps secondaire porteur d'un chromophore ou par le marquage direct de l'anticorps primaire (anticorps de l'invention dirigé contre la séquence phosphorylée). L'incubation simultanée avec un composé capable de lier ladite séquence phosphorylée entraîne sa fixation et le masquage du site reconnu par l'anticorps. La visualisation de cette interaction pourra donc être réalisée et quantifiée par la baisse de liaison de l'anticorps.

DESCRIPTION DES FIGURES

La Figure 1 représente un spectre de masse du peptide monophosphorylé, 353-S_(p)VTPPEEQQEAEEPK-367. L'axe des abscisses correspond au rapport m/z et l'axe des ordonnées correspond au pourcentage d'abondance relative.

Les Figures 2A, 2B et 2C représentent les résultats d'analyses western blot avec l'anticorps monoclonal SE96 (Figure 2A), avec l'anticorps anti- α MBP (New England Biolabs)(Figure 2B) et avec l'anticorps anti- α Aurora A (voir demande de brevet français 02/07212)(Figure 2C). Dans ces Figures, la première colonne correspond à la protéine kinase Aurora A ; la seconde colonne à une protéine recombinante MBP-CDC25B ; la troisième colonne correspond à la protéine kinase Aurora A et à la protéine recombinante MBP-CDC25B et la quatrième colonne correspond à MBP seule.

Les Figures 3a à 3h représentent des images d'immunofluorescence indirecte réalisées sur des cellules HeLa avec l'anticorps SE96.

Dans les Figures 3a, 3c, 3e et 3g, les cellules HeLa ont été fixées et utilisées pour effectuer une analyse par immunofluorescence avec les anticorps SE96 et elles ont également été colorées avec du DAPI.

Dans les Figures 3b, 3d, 3f et 3h, les cellules HeLa ont été fixées et utilisées pour effectuer une analyse par immunofluorescence avec les anticorps SE96.

Les cellules HeLa des Figures 3c et 3d ont été mises en compétition avec le peptide phosphorylé ayant servi à l'immunisation (SEQ ID NO : 2) ; les cellules HeLa des Figures 3e et 3f ont été mises en compétition avec le peptide non phosphorylé (QNKRRRSVTPPEEQ) ; et les cellules HeLa des Figures 3g et 3h ont été mises en compétition avec un peptide phosphorylé sans rapport avec la serine 353 (MEVEELS_(p)PLALGR).

Ces Figures démontrent que le marquage observé avec l'anticorps SE96 est bien éliminé par le peptide immunogène sous sa forme phosphorylée, mais pas par le même peptide non phosphorylé. Par ailleurs, un peptide phosphorylé irrelevant n'a aucun effet compétiteur, démontrant la spécificité vis-à-vis de la séquence phosphorylé et non de la présence du groupement phosphate uniquement.

METHODES ET RESULTATS

La kinase Aurora A recombinante phosphoryle CDC25B3 sur la sérine 353

La protéine recombinante CDC25B3 est phosphorylée *in vitro* par la kinase recombinante Aurora A. Le produit de la réaction de phosphorylation a été analysé par spectrométrie de masse après excision du gel d'électrophorèse et digestion tryptique. Le spectre MS/MS du peptide monophosphorylé, 353-SVTPPEEQQEAEPK-367 est présenté en Figure 1. Son analyse indique que c'est la sérine 353 qui est phosphorylée par la kinase.

De même, il a été montré que la kinase Aurora A recombinante phosphoryle CDC25B1 sur la sérine 339, CDC25B2 sur la sérine 312, CDC25B4 sur la sérine 374 et CDC25B5 sur la sérine 361.

Production d'anticorps contre la protéine CDC25B phosphorylée par la kinase Aurora A

Le peptide de séquence QNKRRRS(p)VTPPEEQ (SEQ ID NO : 2) a été utilisé pour l'immunisation de lapins. Après sacrifice des animaux, le sérum a été purifié par chromatographie en deux étapes : la première sur une colonne de peptide phosphorylé pour retenir les anticorps spécifiques, puis la deuxième sur une colonne du même peptide non phosphorylé de séquence QNKRRRSVTPPEEQ, de manière à purifier dans l'éluat les anticorps spécifiques de la forme phosphorylée. La reconnaissance du peptide phosphorylé par les anticorps a été validée dans un test ELISA. Dans la suite du document, ces anticorps seront désignés sous le nom de SE96.

L'anticorps SE96 reconnaît CDC25B phosphorylé par Aurora A

Des protéines recombinantes CDC25B-MBP (Maltose Binding protein) ou MBP seule ont été incubées en présence ou non de kinase Aurora A. Les échantillons ont ensuite été analysés par transfert de protéines (western blot) avec l'anticorps SE96 et des anticorps permettant la reconnaissance de la MBP et d'Aurora A. Comme le montre la Figure 2, la protéine CDC25B phosphorylée par Aurora A est reconnue par SE96, ce qui valide l'utilisation de cet anticorps dans un test Western blot.

La protéine CDC25B phosphorylée sur la sérine 353 est localisée au niveau du centrosome

Des cellules HeLa ont été fixées et utilisées pour effectuer une analyse par immunofluorescence avec les anticorps SE96. Les cellules ont également été colorées avec le 4'-6 diamino-2-phenylindole (DAPI) pour localiser le noyau. Les images présentées à la Figure 3 sont représentatives d'observations sur un grand nombre de cellules. Elles indiquent que la protéine CDC25B phosphorylée sur la sérine 353 est localisée au niveau des centrosomes des cellules en mitose. Ce marquage est aboli lorsqu'une compétition est réalisée avec le peptide phosphorylé ayant servi à l'immunisation (SEQ ID NO : 2), mais pas avec le peptide non phosphorylé (QNKRRRSVTPPEEQ) ni avec un peptide phosphorylé sans rapport avec la serine 353 (MEVEELS(p)PLALGR). Ces observations valident l'utilisation de ce réactif en immunofluorescence.

RÉFÉRENCES

- 5 – Baldin, V., Cans, C., Superti-Furga, G. & Ducommun, B (1997) Alternative splicing of the human CDC25B tyrosine phosphatase. Possible implications for growth control? *Oncogene*, **14**, 2485-2495,
- 10 – Bischoff, J. R. et al. (1998) A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers, *EMBO J*, **17**, 3052-65,
- 15 – Davezac, N. et al. (2000) Regulation of CDC25B phosphatases subcellular localization, *Oncogene*, **19**, 2179-85,
- 20 – Dutertre, S., Descamps, S. & Prigent, C. (2002) On the role of aurora-A in centrosome function, *Oncogene*, **21**, 6175-83,
- 25 – Forrest, A. & Gabrielli, B. (2001) Cdc25B activity is regulated by 14-3-3, *Oncogene*, **20**, 4393-401,
- 30 – Gabrielli, B. G. et al. (1996) Cytoplasmic accumulation of CDC25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells, *J. Cell. Science*, **109**, 1081-1093,
- 35 – Giet, R. & Prigent, C. (2000) The Xenopus laevis aurora/Ip11p-related kinase pEg2 participates in the stability of the bipolar mitotic spindle, *Exp Cell Res*, **258**, 145-51,
- 40 – Giet, R. et al. (2002) Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules, *J Cell Biol*, **156**, 437-51,
- 45 – Hoffmann, I., Clarke, P., Marcote, M. J., Karsenti, E. & Draetta, G. (1993) Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self amplification of MPF at mitosis, *EMBO J*, **12**, 53-63,
- 50 – Kumagai, A. & Dunphy, W. (1992) Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in Xenopus extracts, *Cell*, **70**, 139-151,
- 55 – Meraldi, P., Honda, R. & Nigg, E. A. (2002) Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53-/- cells, *Embo J*, **21**, 483-92,
- 60 – Mils, V. et al. (2000) Specific interaction between 14.3.3 isoforms and the human CDC25B phosphatase, *Oncogene*, **19**, 1257-1265,
- 65 – Nilsson, I. & Hoffmann, I. (2000) Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family, *Prog Cell Cycle Res*, **4**, 107-14,
- 70 – Zhou, H. et al. (1998) Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation, *Nat Genet*, **20**, 189-93.

REVENDICATIONS

5 1. Séquence peptidique caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par un fragment d'au moins environ 10 acides aminés issus de la séquence SEQ ID NO : 1 suivante :

TPVQNKRRRS_PVTPPEEQQE SEQ ID NO : 1

dans laquelle le résidu sérine en position 10 est phosphorylé,
ledit fragment susmentionné contenant ledit résidu sérine phosphorylé.

10

2. Séquence peptidique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par la séquence SEQ ID NO : 2 suivante :

QNKRRRS_PVTPPEEQ SEQ ID NO : 2

dans laquelle le résidu sérine en position 7 est phosphorylé.

15

3. Séquence peptidique selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par l'une des séquences suivantes :

20 – la séquence SEQ ID NO : 3, représentant le variant d'épissage CDC25B1 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 339 est phosphorylé, ou

25 – la séquence SEQ ID NO : 4, représentant un variant d'épissage CDC25B2 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 312 est phosphorylé, ou

– la séquence SEQ ID NO : 5, représentant un variant d'épissage CDC25B3 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 353 est phosphorylé, ou

30 – la séquence SEQ ID NO : 6, représentant un variant d'épissage CDC25B4 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 374 est phosphorylé, ou

– la séquence SEQ ID NO : 7, représentant un variant d'épissage CDC25B5 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 361 est phosphorylé.

4. Anticorps polyclonal ou monoclonal susceptible de reconnaître une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

5. 5. Anticorps polyclonal susceptible de reconnaître la séquence SEQ ID NO : 2

telle que définie dans la revendication 2.

6. Procédé de préparation d'un anticorps monoclonal selon la revendication 4, dirigé contre la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 telle que définie dans la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 10 – l'immunisation d'un animal par injection de la séquence peptidique selon la revendication 2,
- la fusion entre des myélomes d'un animal et des splénocytes d'un animal afin d'obtenir des hybridomes,
- la mise en culture des hybridomes ainsi obtenus, et
- 15 – la récupération et purification par clonage d'un hybridome, choisi parmi ceux obtenus à l'étape précédente et sécrétant un anticorps dirigé contre la séquence peptidique selon la revendication 2.

20 7. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient à titre de substance active une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, un anticorps selon la revendication 4 ou 5, en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable.

25 8. Utilisation d'une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, d'un anticorps selon la revendication 4 ou 5, pour la préparation de médicaments destinés au traitement de cancers, tels que les cancers du sein.

30 9. Utilisation d'un anticorps selon la revendication 4 ou 5, pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic ou pronostic *in vitro* de cancers chez l'homme ou l'animal, notamment de cancers du sein.

10. Méthode de diagnostic ou pronostic *in vitro* de cancers, notamment de cancers du sein, chez l'homme ou l'animal, caractérisée en ce qu'elle comprend :

5 – la mise en présence d'un anticorps selon la revendication 4 ou 5, avec un échantillon biologique prélevé chez un individu, ledit anticorps étant le cas échéant fixé sur un support solide, et

10 – la détection d'une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique à l'aide de réactifs marqués, notamment d'anticorps marqués, reconnaissant soit l'anticorps lié à ladite séquence peptidique, soit la séquence peptidique liée audit anticorps dans les complexes formés lors de l'étape précédente entre l'anticorps et la séquence peptidique susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique, et ce, le cas échéant, après rinçage approprié du support solide.

15. Procédé de criblage d'une molécule capable de se lier à une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ladite molécule étant susceptible d'être utilisée comme agent anti-tumoral ou agent anti-prolifératif, caractérisé en ce qu'il comprend :

20 – la mise en présence de ladite molécule avec la séquence peptidique susmentionnée, et

 – la détection de la liaison de ladite molécule par l'utilisation de méthodes de compétition appropriées, notamment par la compétition vis-à-vis de la liaison d'un anticorps selon la revendication 4 ou 5.

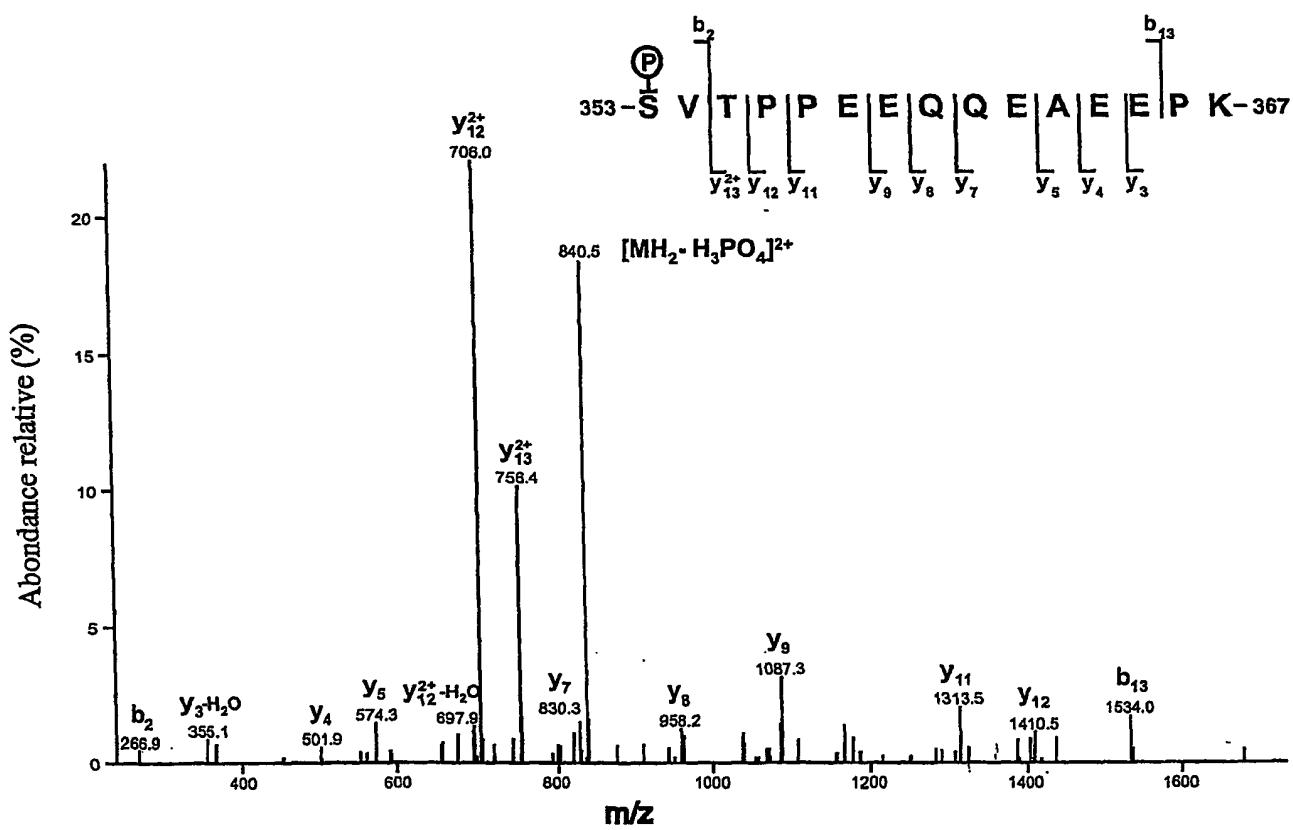
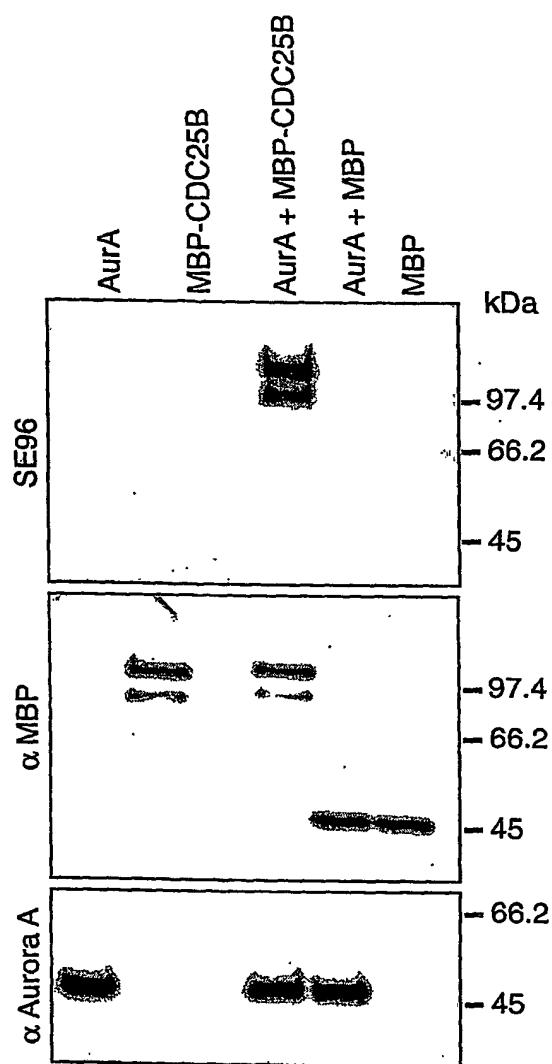
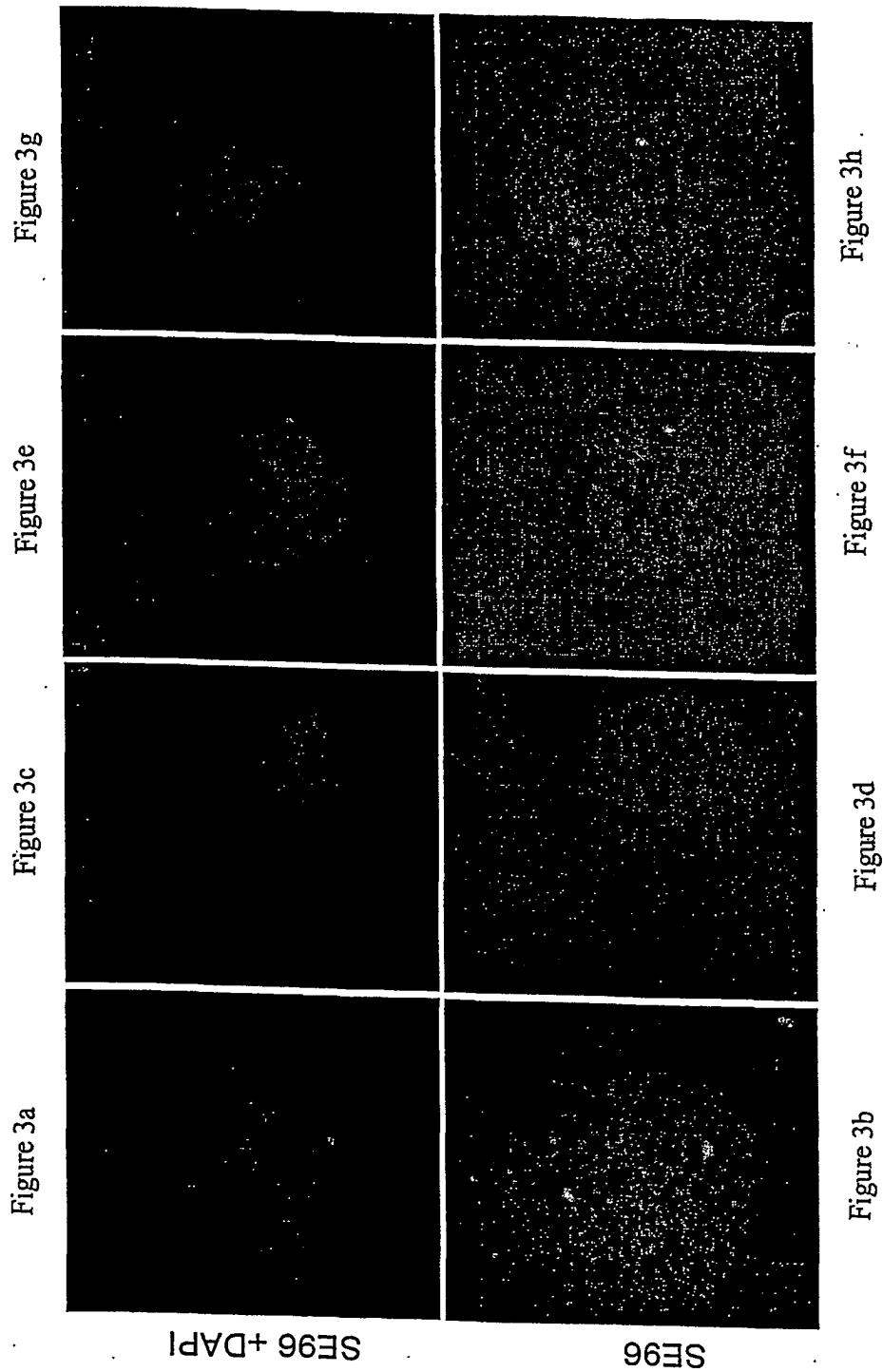


FIGURE 1

**FIGURE 2**



LISTE DE SEQUENCES

<110> CNRS
UNIVERSITE DE RENNES I
UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III

<120> NOUVELLES SEQUENCES PHOSPHORYLEES DE LA PHOSPHATASE CDC25B,
ANTICORPS DIRIGES CONTRE CES SEQUENCES AINSI QUE
LEUR UTILISATION

<130> WO 03 BH CNR CD25

<150> FR 03/07095
<151> 2003-06-12

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 19
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> PHOSPHORYLATION

<400> 1
Thr Pro Val Gln Asn Lys Arg Arg Arg Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu
1 5 10 15
Gln Gln Glu

<210> 2
<211> 14
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> PHOSPHORYLATION

<400> 2
Gln Asn Lys Arg Arg Arg Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu Gln
1 5 10

<210> 3
<211> 566
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (339)..(339)
<223> PHOSPHORYLATION

<400> 3
Met Glu Val Pro Gln Pro Glu Pro Ala Pro Gly Ser Ala Leu Ser Pro
1 5 10 15
Ala Gly Val Cys Gly Gly Ala Gln Arg Pro Gly His Leu Pro Gly Leu
20 25 30
Leu Leu Gly Ser His Gly Leu Leu Gly Ser Pro Val Arg Ala Ala Ala
35 40 45
Ser Ser Pro Val Thr Thr Leu Thr Gln Thr Met His Asp Leu Ala Gly
50 55 60
Leu Gly Ser Arg Ser Arg Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Arg Arg Ala
65 70 75 80
Ser Glu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ala Gly
85 90 95
Leu Cys Met Asp Ser Pro Ser Pro Met Asp Pro His Met Ala Glu Gln
100 105 110
Thr Phe Glu Gln Ala Ile Gln Ala Ala Ser Arg Ile Ile Arg Asn Glu
115 120 125
Gln Phe Ala Ile Arg Arg Phe Gln Ser Met Pro Val Arg Leu Leu Gly
130 135 140
His Ser Pro Val Leu Arg Asn Ile Thr Asn Ser Gln Ala Pro Asp Gly
145 150 155 160
Arg Arg Lys Ser Glu Ala Gly Ser Gly Ala Ala Ser Ser Ser Gly Glu
165 170 175
Asp Lys Glu Asn Asp Gly Phe Val Phe Lys Met Pro Trp Lys Pro Thr
180 185 190
His Pro Ser Ser Thr His Ala Leu Ala Glu Trp Ala Ser Arg Arg Glu
195 200 205
Ala Phe Ala Gln Arg Pro Ser Ser Ala Pro Asp Leu Met Cys Leu Ser
210 215 220
Pro Asp Arg Lys Met Glu Val Glu Glu Leu Ser Pro Leu Ala Leu Gly
225 230 235 240
Arg Phe Ser Leu Thr Pro Ala Glu Gly Asp Thr Glu Glu Asp Asp Gly
245 250 255
Phe Val Asp Ile Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asp Asp Asp Ala Val Pro
260 265 270
Pro Gly Met Glu Ser Leu Ile Ser Ala Pro Leu Val Lys Thr Leu Glu
275 280 285
Lys Glu Glu Glu Lys Asp Leu Val Met Tyr Ser Lys Cys Gln Arg Leu
290 295 300
Phe Arg Ser Pro Ser Met Pro Cys Ser Val Ile Arg Pro Ile Leu Lys
305 310 315 320

Arg Leu Glu Arg Pro Gln Asp Arg Asp Thr Pro Val Gln Asn Lys Arg
325 330 335

Arg Arg Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu Gln Gln Glu Ala Glu Glu Pro
340 345 350

Lys Ala Arg Val Leu Arg Ser Lys Ser Leu Cys His Asp Glu Ile Glu
355 360 365

Asn Leu Leu Asp Ser Asp His Arg Glu Leu Ile Gly Asp Tyr Ser Lys
370 375 380

Ala Phe Leu Leu Gln Thr Val Asp Gly Lys His Gln Asp Leu Lys Tyr
385 390 395 400

Ile Ser Pro Glu Thr Met Val Ala Leu Leu Thr Gly Lys Phe Ser Asn
405 410 415

Ile Val Asp Lys Phe Val Ile Val Asp Cys Arg Tyr Pro Tyr Glu Tyr
420 425 430

Glu Gly Gly His Ile Lys Thr Ala Val Asn Leu Pro Leu Glu Arg Asp
435 440 445

Ala Glu Ser Phe Leu Leu Lys Ser Pro Ile Ala Pro Cys Ser Leu Asp
450 455 460

Lys Arg Val Ile Leu Ile Phe His Cys Glu Phe Ser Ser Glu Arg Gly
465 470 475 480

Pro Arg Met Cys Arg Phe Ile Arg Glu Arg Asp Arg Ala Val Asn Asp
485 490 495

Tyr Pro Ser Leu Tyr Tyr Pro Glu Met Tyr Ile Leu Lys Gly Gly Tyr
500 505 510

Lys Glu Phe Phe Pro Gln His Pro Asn Phe Cys Glu Pro Gln Asp Tyr
515 520 525

Arg Pro Met Asn His Glu Ala Phe Lys Asp Glu Leu Lys Thr Phe Arg
530 535 540

Leu Lys Thr Arg Ser Trp Ala Gly Glu Arg Ser Arg Arg Glu Leu Cys
545 550 555 560

Ser Arg Leu Gln Asp Gln
565

<210> 4
<211> 539
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (312)..(312)
<223> PHOSPHORYLATION

<400> 4
Met Glu Val Pro Gln Pro Glu Pro Ala Pro Gly Ser Ala Leu Ser Pro
1 5 10 15
Ala Gly Val Cys Gly Gly Ala Gln Arg Pro Gly His Leu Pro Gly Leu
20 25 30
Leu Leu Gly Ser His Gly Leu Leu Gly Ser Pro Val Arg Ala Ala Ala
35 40 45
Ser Ser Pro Val Thr Thr Leu Thr Gln Thr Met His Asp Leu Ala Gly
50 55 60
Leu Gly Ser Glu Thr Pro Lys Ser Gln Val Gly Thr Leu Leu Phe Arg
65 70 75 80
Ser Arg Ser Arg Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Arg Arg Ala Ser Glu
85 90 95
Ser Ser Leu Ser Ser Glu Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ala Gly Leu Cys
100 105 110
Met Asp Ser Pro Ser Pro Met Asp Pro His Met Ala Glu Gln Thr Phe
115 120 125
Glu Gln Ala Ile Gln Ala Ala Ser Arg Ile Ile Arg Asn Glu Gln Phe
130 135 140
Ala Ile Arg Arg Phe Gln Ser Met Pro Asp Gly Phe Val Phe Lys Met
145 150 155 160
Pro Trp Lys Pro Thr His Pro Ser Ser Thr His Ala Leu Ala Glu Trp
165 170 175
Ala Ser Arg Arg Glu Ala Phe Ala Gln Arg Pro Ser Ser Ala Pro Asp
180 185 190
Leu Met Cys Leu Ser Pro Asp Arg Lys Met Glu Val Glu Glu Leu Ser
195 200 205
Pro Leu Ala Leu Gly Arg Phe Ser Leu Thr Pro Ala Glu Gly Asp Thr
210 215 220
Glu Glu Asp Asp Gly Phe Val Asp Ile Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asp
225 230 235 240
Asp Asp Ala Val Pro Pro Gly Met Glu Ser Leu Ile Ser Ala Pro Leu
245 250 255
Val Lys Thr Leu Glu Lys Glu Glu Glu Lys Asp Leu Val Met Tyr Ser
260 265 270
Lys Cys Gln Arg Leu Phe Arg Ser Pro Ser Met Pro Cys Ser Val Ile
275 280 285
Arg Pro Ile Leu Lys Arg Leu Glu Arg Pro Gln Asp Arg Asp Thr Pro
290 295 300
Val Gln Asn Lys Arg Arg Arg Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu Gln Gln
305 310 315 320

Glu Ala Glu Glu Pro Lys Ala Arg Val Leu Arg Ser Lys Ser Leu Cys
325 330 335

His Asp Glu Ile Glu Asn Leu Leu Asp Ser Asp His Arg Glu Leu Ile
340 345 350

Gly Asp Tyr Ser Lys Ala Phe Leu Leu Gln Thr Val Asp Gly Lys His
355 360 365

Gln Asp Leu Lys Tyr Ile Ser Pro Glu Thr Met Val Ala Leu Leu Thr
370 375 380

Gly Lys Phe Ser Asn Ile Val Asp Lys Phe Val Ile Val Asp Cys Arg
385 390 395 400

Tyr Pro Tyr Glu Tyr Glu Gly Gly His Ile Lys Thr Ala Val Asn Leu
405 410 415

Pro Leu Glu Arg Asp Ala Glu Ser Phe Leu Leu Lys Ser Pro Ile Ala
420 425 430

Pro Cys Ser Leu Asp Lys Arg Val Ile Leu Ile Phe His Cys Glu Phe
435 440 445

Ser Ser Glu Arg Gly Pro Arg Met Cys Arg Phe Ile Arg Glu Arg Asp
450 455 460

Arg Ala Val Asn Asp Tyr Pro Ser Leu Tyr Tyr Pro Glu Met Tyr Ile
465 470 475 480

Leu Lys Gly Gly Tyr Lys Glu Phe Phe Pro Gln His Pro Asn Phe Cys
485 490 495

Glu Pro Gln Asp Tyr Arg Pro Met Asn His Glu Ala Phe Lys Asp Glu
500 505 510

Leu Lys Thr Phe Arg Leu Lys Thr Arg Ser Trp Ala Gly Glu Arg Ser
515 520 525

Arg Arg Glu Leu Cys Ser Arg Leu Gln Asp Gln
530 535

<210> 5

<211> 580

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (353)..(353)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 5

Met Glu Val Pro Gln Pro Glu Pro Ala Pro Gly Ser Ala Leu Ser Pro
1 5 10 15

Ala Gly Val Cys Gly Gly Ala Gln Arg Pro Gly His Leu Pro Gly Leu
20 25 30

Leu Leu Gly Ser His Gly Leu Leu Gly Ser Pro Val Arg Ala Ala Ala
35 40 45

Ser Ser Pro Val Thr Thr Leu Thr Gln Thr Met His Asp Leu Ala Gly
50 55 60

Leu Gly Ser Glu Thr Pro Lys Ser Gln Val Gly Thr Leu Leu Phe Arg
65 70 75 80

Ser Arg Ser Arg Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Arg Arg Ala Ser Glu
85 90 95

Ser Ser Leu Ser Ser Glu Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ala Gly Leu Cys
100 105 110

Met Asp Ser Pro Ser Pro Met Asp Pro His Met Ala Glu Gln Thr Phe
115 120 125

Glu Gln Ala Ile Gln Ala Ala Ser Arg Ile Ile Arg Asn Glu Gln Phe
130 135 140

Ala Ile Arg Arg Phe Gln Ser Met Pro Val Arg Leu Leu Gly His Ser
145 150 155 160

Pro Val Leu Arg Asn Ile Thr Asn Ser Gln Ala Pro Asp Gly Arg Arg
165 170 175

Lys Ser Glu Ala Gly Ser Gly Ala Ala Ser Ser Ser Gly Glu Asp Lys
180 185 190

Glu Asn Asp Gly Phe Val Phe Lys Met Pro Trp Lys Pro Thr His Pro
195 200 205

Ser Ser Thr His Ala Leu Ala Glu Trp Ala Ser Arg Arg Glu Ala Phe
210 215 220

Ala Gln Arg Pro Ser Ser Ala Pro Asp Leu Met Cys Leu Ser Pro Asp
225 230 235 240

Arg Lys Met Glu Val Glu Glu Leu Ser Pro Leu Ala Leu Gly Arg Phe
245 250 255

Ser Leu Thr Pro Ala Glu Gly Asp Thr Glu Glu Asp Asp Gly Phe Val
260 265 270

Asp Ile Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asp Asp Asp Ala Val Pro Pro Gly
275 280 285

Met Glu Ser Leu Ile Ser Ala Pro Leu Val Lys Thr Leu Glu Lys Glu
290 295 300

Glu Glu Lys Asp Leu Val Met Tyr Ser Lys Cys Gln Arg Leu Phe Arg
305 310 315 320

Ser Pro Ser Met Pro Cys Ser Val Ile Arg Pro Ile Leu Lys Arg Leu
325 330 335

Glu Arg Pro Gln Asp Arg Asp Thr Pro Val Gln Asn Lys Arg Arg Arg
340 345 350

Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu Gln Gln Glu Ala Glu Glu Pro Lys Ala
 355 360 365
 Arg Val Leu Arg Ser Lys Ser Leu Cys His Asp Glu Ile Glu Asn Leu
 370 375 380
 Leu Asp Ser Asp His Arg Glu Leu Ile Gly Asp Tyr Ser Lys Ala Phe
 385 390 395 400
 Leu Leu Gln Thr Val Asp Gly Lys His Gln Asp Leu Lys Tyr Ile Ser
 405 410 415
 Pro Glu Thr Met Val Ala Leu Leu Thr Gly Lys Phe Ser Asn Ile Val
 420 425 430
 Asp Lys Phe Val Ile Val Asp Cys Arg Tyr Pro Tyr Glu Tyr Glu Gly
 435 440 445
 Gly His Ile Lys Thr Ala Val Asn Leu Pro Leu Glu Arg Asp Ala Glu
 450 455 460
 Ser Phe Leu Leu Lys Ser Pro Ile Ala Pro Cys Ser Leu Asp Lys Arg
 465 470 475 480
 Val Ile Leu Ile Phe His Cys Glu Phe Ser Ser Glu Arg Gly Pro Arg
 485 490 495
 Met Cys Arg Phe Ile Arg Glu Arg Asp Arg Ala Val Asn Asp Tyr Pro
 500 505 510
 Ser Leu Tyr Tyr Pro Glu Met Tyr Ile Leu Lys Gly Gly Tyr Lys Glu
 515 520 525
 Phe Phe Pro Gln His Pro Asn Phe Cys Glu Pro Gln Asp Tyr Arg Pro
 530 535 540
 Met Asn His Glu Ala Phe Lys Asp Glu Leu Lys Thr Phe Arg Leu Lys
 545 550 555 560
 Thr Arg Ser Trp Ala Gly Glu Arg Ser Arg Arg Glu Leu Cys Ser Arg
 565 570 575
 Leu Gln Asp Gln
 580

<210> 6
 <211> 601
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (374)..(374)
 <223> PHOSPHORYLATION

<400> 6
 Met Glu Val Pro Gln Pro Glu Pro Ala Pro Gly Ser Ala Leu Ser Pro
 1 5 10 15

Ala Gly Val Cys Gly Gly Ala Gln Arg Pro Gly His Leu Pro Gly Leu
20 25 30

Leu Leu Gly Ser His Gly Leu Leu Gly Ser Pro Val Arg Ala Ala Ala
35 40 45

Ser Ser Pro Val Thr Thr Leu Thr Gln Thr Met His Asp Leu Ala Gly
50 55 60

Leu Gly Ser Arg Ser Arg Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Arg Arg Ala
65 70 75 80

Ser Glu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ala Gly
85 90 95

Leu Cys Met Asp Ser Pro Ser Pro Met Asp Pro His Met Ala Glu Gln
100 105 110

Thr Phe Glu Gln Ala Ile Gln Ala Ala Ser Arg Ile Ile Arg Asn Glu
115 120 125

Gln Phe Ala Ile Arg Arg Phe Gln Ser Met Pro Val Arg Leu Leu Gly
130 135 140

His Ser Pro Val Leu Arg Asn Ile Thr Asn Ser Gln Ala Pro Asp Gly
145 150 155 160

Arg Arg Lys Ser Glu Ala Gly Ser Gly Ala Ala Ser Ser Ser Gly Glu
165 170 175

Asp Lys Glu Asn Val Arg Phe Trp Lys Ala Gly Val Gly Ala Leu Arg
180 185 190

Glu Glu Glu Gly Ala Cys Trp Gly Gly Ser Leu Ala Cys Glu Asp Pro
195 200 205

Pro Leu Pro Ser Trp Leu Gln Asp Gly Phe Val Phe Lys Met Pro Trp
210 215 220

Lys Pro Thr His Pro Ser Ser Thr His Ala Leu Ala Glu Trp Ala Ser
225 230 235 240

Arg Arg Glu Ala Phe Ala Gln Arg Pro Ser Ser Ala Pro Asp Leu Met
245 250 255

Cys Leu Ser Pro Asp Arg Lys Met Glu Val Glu Glu Leu Ser Pro Leu
260 265 270

Ala Leu Gly Arg Phe Ser Leu Thr Pro Ala Glu Gly Asp Thr Glu Glu
275 280 285

Asp Asp Gly Phe Val Asp Ile Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asp Asp Asp
290 295 300

Ala Val Pro Pro Gly Met Glu Ser Leu Ile Ser Ala Pro Leu Val Lys
305 310 315 320

Thr Leu Glu Lys Glu Glu Lys Asp Leu Val Met Tyr Ser Lys Cys
325 330 335

Gln Arg Leu Phe Arg Ser Pro Ser Met Pro Cys Ser Val Ile Arg Pro
340 345 350

Ile Leu Lys Arg Leu Glu Arg Pro Gln Asp Arg Asp Thr Pro Val Gln
355 360 365

Asn Lys Arg Arg Arg Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu Gln Gln Glu Ala
370 375 380

Glu Glu Pro Lys Ala Arg Val Leu Arg Ser Lys Ser Leu Cys His Asp
385 390 395 400

Glu Ile Glu Asn Leu Leu Asp Ser Asp His Arg Glu Leu Ile Gly Asp
405 410 415

Tyr Ser Lys Ala Phe Leu Leu Gln Thr Val Asp Gly Lys His Gln Asp
420 425 430

Leu Lys Tyr Ile Ser Pro Glu Thr Met Val Ala Leu Leu Thr Gly Lys
435 440 445

Phe Ser Asn Ile Val Asp Lys Phe Val Ile Val Asp Cys Arg Tyr Pro
450 455 460

Tyr Glu Tyr Glu Gly Gly His Ile Lys Thr Ala Val Asn Leu Pro Leu
465 470 475 480

Glu Arg Asp Ala Glu Ser Phe Leu Leu Lys Ser Pro Ile Ala Pro Cys
485 490 495

Ser Leu Asp Lys Arg Val Ile Leu Ile Phe His Cys Glu Phe Ser Ser
500 505 510

Glu Arg Gly Pro Arg Met Cys Arg Phe Ile Arg Glu Arg Asp Arg Ala
515 520 525

Val Asn Asp Tyr Pro Ser Leu Tyr Tyr Pro Glu Met Tyr Ile Leu Lys
530 535 540

Gly Gly Tyr Lys Glu Phe Phe Pro Gln His Pro Asn Phe Cys Glu Pro
545 550 555 560

Gln Asp Tyr Arg Pro Met Asn His Glu Ala Phe Lys Asp Glu Leu Lys
565 570 575

Thr Phe Arg Leu Lys Thr Arg Ser Trp Ala Gly Glu Arg Ser Arg Arg
580 585 590

Glu Leu Cys Ser Arg Leu Gln Asp Gln
595 600

<210> 7

<211> 588

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (361)..(361)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 7
Met Glu Val Pro Gln Pro Glu Pro Ala Pro Gly Ser Ala Leu Ser Pro
1 5 10 15
Ala Gly Val Cys Gly Gly Ala Gln Arg Pro Gly His Leu Pro Gly Leu
20 25 30
Leu Leu Gly Ser His Gly Leu Leu Gly Ser Pro Val Arg Ala Ala Ala
35 40 45
Ser Ser Pro Val Thr Thr Leu Thr Gln Thr Met His Asp Leu Ala Gly
50 55 60
Leu Gly Ser Glu Thr Pro Lys Ser Gln Val Gly Thr Leu Leu Phe Arg
65 70 75 80
Ser Arg Ser Arg Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Arg Arg Ala Ser Glu
85 90 95
Ser Ser Leu Ser Ser Glu Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ala Gly Leu Cys
100 105 110
Met Asp Ser Pro Ser Pro Met Asp Pro His Met Ala Glu Gln Thr Phe
115 120 125
Glu Gln Ala Ile Gln Ala Ala Ser Arg Ile Ile Arg Asn Glu Gln Phe
130 135 140
Ala Ile Arg Arg Phe Gln Ser Met Pro Val Arg Leu Leu Gly His Ser
145 150 155 160
Pro Val Leu Arg Asn Ile Thr Asn Ser Gln Ala Pro Asp Gly Arg Arg
165 170 175
Lys Ser Glu Ala Gly Ser Gly Ala Ala Ser Ser Ser Gly Glu Asp Lys
180 185 190
Glu Asn Val Arg Phe Trp Lys Ala Gly Val Gly Ala Leu Arg Glu Glu
195 200 205
Glu Gly Ala Cys Trp Gly Gly Ser Leu Ala Cys Glu Asp Pro Pro Leu
210 215 220
Pro Ser Trp Leu Gln Asp Gly Phe Val Phe Lys Met Pro Trp Lys Pro
225 230 235 240
Thr His Pro Ser Ser Thr His Ala Leu Ala Glu Trp Ala Ser Arg Arg
245 250 255
Glu Ala Phe Ala Gln Arg Pro Ser Ser Ala Pro Asp Leu Met Cys Leu
260 265 270
Ser Pro Asp Arg Lys Met Glu Val Glu Glu Leu Ser Pro Leu Ala Leu
275 280 285
Gly Arg Phe Ser Leu Thr Pro Ala Glu Gly Asp Thr Glu Glu Asp Asp
290 295 300
Gly Phe Val Asp Ile Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asp Leu Val Met Tyr
305 310 315 320

Ser Lys Cys Gln Arg Leu Phe Arg Ser Pro Ser Met Pro Cys Ser Val
325 330 335

Ile Arg Pro Ile Leu Lys Arg Leu Glu Arg Pro Gln Asp Arg Asp Thr
340 345 350

Pro Val Gln Asn Lys Arg Arg Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu Gln
355 360 365

Gln Glu Ala Glu Glu Pro Lys Ala Arg Val Leu Arg Ser Lys Ser Leu
370 375 380

Cys His Asp Glu Ile Glu Asn Leu Leu Asp Ser Asp His Arg Glu Leu
385 390 395 400

Ile Gly Asp Tyr Ser Lys Ala Phe Leu Leu Gln Thr Val Asp Gly Lys
405 410 415

His Gln Asp Leu Lys Tyr Ile Ser Pro Glu Thr Met Val Ala Leu Leu
420 425 430

Thr Gly Lys Phe Ser Asn Ile Val Asp Lys Phe Val Ile Val Asp Cys
435 440 445

Arg Tyr Pro Tyr Glu Tyr Glu Gly Gly His Ile Lys Thr Ala Val Asn
450 455 460

Leu Pro Leu Glu Arg Asp Ala Glu Ser Phe Leu Leu Lys Ser Pro Ile
465 470 475 480

Ala Pro Cys Ser Leu Asp Lys Arg Val Ile Leu Ile Phe His Cys Glu
485 490 495

Phe Ser Ser Glu Arg Gly Pro Arg Met Cys Arg Phe Ile Arg Glu Arg
500 505 510

Asp Arg Ala Val Asn Asp Tyr Pro Ser Leu Tyr Tyr Pro Glu Met Tyr
515 520 525

Ile Leu Lys Gly Gly Tyr Lys Glu Phe Phe Pro Gln His Pro Asn Phe
530 535 540

Cys Glu Pro Gln Asp Tyr Arg Pro Met Asn His Glu Ala Phe Lys Asp
545 550 555 560

Glu Leu Lys Thr Phe Arg Leu Lys Thr Arg Ser Trp Ala Gly Glu Arg
565 570 575

Ser Arg Arg Glu Leu Cys Ser Arg Leu Gln Asp Gln
580 585

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/001416

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12N9/16 C07K16/40 A61K38/43 A61P35/00 G01N33/68
 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 C12N G01N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	<p>WO 02/099110 A (TAIHO PHARMACEUTICAL CO LTD ; NAKANISHI MAKOTO (JP)) 12 December 2002 (2002-12-12) abstract & EP 1 396 545 A (TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.; NAKASHINI, MAKOTO (JP)) 10 March 2004 (2004-03-10) page 1 - page 4</p> <p>-----</p> <p>BULAVIN DV ET AL.: "Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase" NATURE, vol. 411, 3 May 2001 (2001-05-03), pages 102-107, XP002277361 * abrégé, page 106, figures 2,4 *</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	
A		

Further documents are listed in the continuation of box C

Patent family members are listed in annex

° Special categories of cited documents

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

23 November 2004

06/12/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schmidt, Harald

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/001416

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	DAVEZAC N ET AL.: "Human pEG3 kinase associates with and phosphorylates CDC25B phosphatase: a potential role for pEg3 in cell cycle regulation" ONCOGENE, vol. 21, no. 50, 31 October 2002 (2002-10-31), pages 7630-7641, XP001190818 page 7634 -----	
A	THEIS-FEBVRE N ET AL.: "Protein kinase CK2 regulates CDC25B phosphatase activity" ONCOGENE, vol. 22, no. 2, 16 January 2003 (2003-01-16), pages 220-232, XP001190817 page 224; figure 3 -----	
A	BALDIN V ET AL.: "Nuclear Localization of CDC25B1 and Serine 146 Integrity Are Required for Induction of Mitosis" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 38, 20 September 2002 (2002-09-20), pages 35176-35182, XP001190816 abstract; figures 1,2,5,7 -----	
P, X	BALDIN V ET AL.: "PKB/Akt phosphorylates the CDC25B phosphatase and regulates its intracellular localisation" BIOLOGY OF THE CELL, vol. 95, no. 8, November 2003 (2003-11), pages 547-554, XP002277362 page 550 - page 553; figure 2 -----	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/001416

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 02099110	A 12-12-2002	EP 1396545 A1		10-03-2004
		WO 02099110 A1		12-12-2002
		US 2004151713 A1		05-08-2004
EP 1396545	A 10-03-2004	EP 1396545 A1		10-03-2004
		US 2004151713 A1		05-08-2004
		WO 02099110 A1		12-12-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/001416

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 7 C12N9/16 C07K16/40
 G01N33/543

A61K38/43

A61P35/00

G01N33/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
 CIB 7 C12N G01N A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visées
A	<p>WO 02/099110 A (TAIHO PHARMACEUTICAL CO LTD ; NAKANISHI MAKOTO (JP)) 12 décembre 2002 (2002-12-12) abrégé & EP 1 396 545 A (TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.; NAKASHINI, MAKOTO (JP)) 10 mars 2004 (2004-03-10) page 1 - page 4</p> <p>-----</p> <p>BULAVIN DV ET AL.: "Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase" NATURE, vol. 411, 3 mai 2001 (2001-05-03), pages 102-107, XP002277361 * abrégé, page 106, figures 2,4 *</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	
A		

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre création ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 novembre 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06/12/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
 Office Européen des Brevets, P B 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Schmidt, Harald

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°

PCT/FR2004/001416

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visées
A	DAVEZAC N ET AL.: "Human pEG3 kinase associates with and phosphorylates CDC25B phosphatase: a potential role for pEg3 in cell cycle regulation" ONCOGENE, vol. 21, no. 50, 31 octobre 2002 (2002-10-31), pages 7630-7641, XP001190818 page 7634 -----	
A	THEIS-FEBVRE N ET AL.: "Protein kinase CK2 regulates CDC25B phosphatase activity" ONCOGENE, vol. 22, no. 2, 16 janvier 2003 (2003-01-16), pages 220-232, XP001190817 page 224; figure 3 -----	
A	BALDIN V ET AL.: "Nuclear Localization of CDC25B1 and Serine 146 Integrity Are Required for Induction of Mitosis" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 38, 20 septembre 2002 (2002-09-20), pages 35176-35182, XP001190816 abrégé; figures 1,2,5,7 -----	
P,X	BALDIN V ET AL.: "PKB/Akt phosphorylates the CDC25B phosphatase and regulates its intracellular localisation" BIOLOGY OF THE CELL, vol. 95, no. 8, novembre 2003 (2003-11), pages 547-554, XP002277362 page 550 - page 553; figure 2 -----	1-6

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements rel
ux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2004/001416

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 02099110	A 12-12-2002	EP 1396545	A1	10-03-2004
		WO 02099110	A1	12-12-2002
		US 2004151713	A1	05-08-2004
EP 1396545	A 10-03-2004	EP 1396545	A1	10-03-2004
		US 2004151713	A1	05-08-2004
		WO 02099110	A1	12-12-2002

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.